

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2739896号

(45) 発行日 平成10年(1998) 4月15日

(24) 登録日 平成10年(1998) 1月23日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
B 0 1 J 13/00		B 0 1 J 13/00	A
A 0 1 N 25/04	1 0 2	A 0 1 N 25/04	1 0 2
A 6 1 K 9/107		A 6 1 K 9/107	B
		9/50	A
		9/14	F
		発明の数 1 (全 5 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願昭62-336704  
 (22) 出願日 昭和62年(1987)12月28日  
 (65) 公開番号 特開昭63-240936  
 (43) 公開日 昭和63年(1988)10月6日  
 審査請求日 平成5年(1993)2月10日  
 審判番号 平6-14690  
 審判請求日 平成6年(1994)8月29日  
 (31) 優先権主張番号 8 6 1 8 4 4 6  
 (32) 優先日 1986年12月31日  
 (33) 優先権主張国 フランス (F R)

(73) 特許権者 999999999  
 センター・ナショナル・ド・ラ・リセル  
 シェ・サイエンティフィック  
 フランス国75007パリ、ケ・アナトー  
 ル・フ랑스・15  
 (72) 発明者 アートン・フェシ  
 フランス国75014パリ、フリアーン・9  
 (72) 発明者 ジェン・フィリップ・ドヴィサージュ  
 フランス国92200ヌイイー・シェル・セ  
 ーヌ、ブルヴァー・ダンカーマン・14  
 (74) 代理人 弁理士 古谷 馨 (外2名)

合議体  
 審判長 主代 静義  
 審判官 山田 充  
 審判官 豊永 茂弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超微粒子状物質の分散コロイド系の製造方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

1. マトリックス型であり、大きさが500nm以下の球状粒子(ナノ粒子)の形状をした生物学的活性物質の分散コロイド系を製造する方法において、

(1) 一又は二以上の界面活性剤を混入しうる溶媒又は混合溶媒中に前記生物学的活性物質とポリマーとを溶解した溶液よりなる第一液相を調製し、ポリマーの溶媒又は混合溶媒中の濃度は0.2重量%乃至2重量%であり、

(2) 一又は二以上の界面活性剤を混入しうる、前記生物学的活性物質とポリマーに対する非溶媒又は混合非溶媒から成り、前記生物学的活性物質とポリマーに対する前記溶媒又は前記混合溶媒とあらゆる割合で混和可能な第二液相を調製し、

(3) 工程(1)又は(2)で調製された前記液相のうち一方を他方の液相に適度に攪拌しながら加えて事実上

2

瞬時に前記生物学的活性物質とポリマーの超微粒子のコロイド状懸濁液を生成し一又は二以上の界面活性剤が該コロイド状懸濁液に対し0.2重量%乃至2重量%の割合で存在し、そして

(4) 所望により前記溶媒又は前記混合溶媒の及び前記非溶媒又は前記混合非溶媒の全て又は一部を除去し、所望の濃度を有するナノ粒子のコロイド状懸濁液を生成し、又はナノ粒子のパウダーを生成することに特徴を有する方法。

2. 前記工程(1)において調製された液相を前記工程(2)において調製された液相に前記工程(3)において加えることを含む、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 前記工程(4)において凍結乾燥法によって前記溶媒及び前記非溶媒の全てを除去することを含む、特許請

10

求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。

4. 直径約200nm程のナノ粒子を生成することを含む、特許請求の範囲第1項乃至第3項いずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明の主題は、マトリックス型の大きさが500nm以下である球形微粒子状物質（超微粒子）の分散コロイド系の製造のための新規な方法を提供することである。

【従来の技術】

直径が500nm以下の超微粒子はすでに公知であり、特にベルギー特許第808,034号、ベルギー特許第839,748号、ベルギー特許第869,107号及びフランス特許公開第2,515,960号において開示されている。ベルギー特許第808,034号及びベルギー特許第839,748号においては、超微粒子は例えばアクリル酸誘導体のようなモノマーのミセル重合によって形成される。同様にベルギー特許第869,107号及びフランス特許公開第2,515,960号においては、アルキルシアノアクリレート重合により得られ生物学的活性物質を含む、微生物分解性を有する超微粒子物質の製造について開示している。これらの方法は、溶液中の重合に依存しており、従って、特にビニル付加によって調製され得る限られた数のポリマーに限定して用いられるものであり、天然高分子や半合成高分子には適していない。さらに、超微粒子を構成するポリマーの分子量をコントロールすることは難しく、そして特に生物学的に使用することが考慮される場合には、高濃度で用いられる場合や生物学的適合性を有さぬ場合には、残留したモノマー及びオリゴマー、或いは必要な場合には、重合反応に関与した過剰の反応剤（開始剤や触媒）や界面活性剤を除去する必要がある。実際には、超微粒子の濾過は、その大きさを考えればいつも可能であるとは限らず、従って精製（超遠心分離法や透析）を行うことは多くの場合煩雑である。

乳化蒸着を採用した方法もすでに開示されており、これらの方法は予め生成したポリマーを用い、水と混和しないポリマーの有機溶液は水性相中に乳化され、その後水に不溶であるポリマーの懸濁を生ぜしめる。しかしながら、この方法の主たる利点は、合成高分子、半合成高分子の多くに適用可能である点にあり、これらの高分子から超微粒子を生産することが可能である点にある。しかし、欠点として500nm以下で大きさが均質な超微粒子を生成するのに必要な超微粒及び均質な懸濁を生成することが困難である点がある。さらに高濃度（20%）の界面活性剤を用いねばならず、またそれを除去せねばならない点、及び高エネルギーを用いた高精度機器（超音波処理機、ホモジナイザーなど）が必要な点は産業上利用する場合に大いなるハンディキャップとなる。

蛋白質を用いた超微粒子の生産についても開示されている。例えばアルブミンのような蛋白質溶液の乳濁の熱

変性による方法〔P.A.クレマー（Kramer, P.A.）：薬学ジャーナル（J.Pharm.Sci）63巻,1646頁（1974年刊）〕、或いは鉍物塩やエタノールを用いたゼラチンのような蛋白溶液を分解する方法〔マーティ（Marty）他、オーストラリア薬学ジャーナル（Austr.J.Pharm.Sci）6巻,65頁（1978年刊）、或いは薬学アクタ（Pharm. Acta.Helv.）53巻, No.1（1978年刊）〕があり、これらの方法とともにアルデヒドによる硬化に依拠している。クレマーの方法の主たる欠点は、連続油相中で大分子量の開始物質の水性相を予め乳化せねばならない点にある。この乳化は超微粒子状に行う必要があるため、界面活性剤や機器（超音波処理機など）を用いねば適切な大きさの超微粒子を生産することができない。マーティの方法に関して言えば、相当量の鉍物塩を用いねばならず、それらはまた除去する必要がある。また、余ったアルデヒドや後に中和剤として加えられた亜硫酸塩や異性亜硫酸塩も除去する必要があるが生じる。

上述した全ての方法は特定の種類の分子に適用できるにすぎず、コストのかかる操作を必然的に伴うものである（超遠心分離法、超音波処理法など）。また、粒子の大きさを許容範囲内で均質にするために、或いは分散コロイド状態を長時間にわたって保つために粒子を十分に細かくするために（500nm以下）、重合化をコントロールすることも困難である。

【発明の解決しようとする課題】

本発明は、上記のような不利益を伴わず、また、天然や合成のポリマー双方に、また様々な有機物質（医薬、脂質など）や各種ミネラル（塩、色素など）、或いはそれらの混合物に適用可能な超微粒子の製造方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

本発明の主題とするところは、マトリックス型で大きさが500nm以下の球形微粒子状生物学的活性物質（超微粒子）の分散コロイド系の製造方法にかかり、該製造方法は：（1）一又は二以上の界面活性剤を混入しうる溶媒又は混合溶媒中に前記生物学的活性物質とポリマーとを溶解した溶液より成る第一液相を調製し、（2）一又は二以上の界面活性剤を混入しうる、前記生物学的活性物質とポリマーに対し非溶媒である非溶媒又は混合非溶媒から成り、前記生物学的活性物質とポリマーに対し溶媒である前記溶媒又は前記混合溶媒とあらゆる割合で混合可能な第二液相を調製し、（3）工程（1）又は（2）で調製された前記液相のうち一方を他方の液相に適度に攪拌しながら加え、実質的に瞬時に前記生物学的活性物質とポリマーの超微粒子のコロイド状懸濁液を生成し、そして（4）所望により前記溶媒又は前記混合溶媒の及び前記非溶媒又は前記混合非溶媒の全て又は一部を除去し、所望の濃度を有する超微粒子のコロイド状懸濁液を生成し、又は超微粒子パウダーを生成する方法である。

工程(3)において超微粒子は実際には瞬間的に形成される。その溶液は乳白色でありコロイド状懸濁液の特色であるチンダル効果がみられる。この工程において、特に工程(2)で調製された液相が水性である場合には、工程(2)で調製された液相に対して工程(1)で調製された液相を加えることが好ましい。

本発明の工程において用いられる「生物学的活性物質及びポリマー」としては、所定の溶媒に十分に可溶な物質であるならば、実際にはいかなる物質であっても構わない。

「前記ポリマー」としては、特に、例えばポリ(d, l)乳酸(PLA)などの合成ポリマー、例えばセルロース、ブチレート、アセテート、エチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロースのフタル酸塩(HFMC P)などの半合成ポリマー、或いは例えばゼラチン、アラビアゴムなどの天然ポリマーの何れかのポリマーであることが好ましい。他の多くのポリマーもまた用いることが可能である。例えばポリビニルのアセトフタレート、セルロースのアセトフタレート；マレイン酸誘導体(例えば商品名ガントレ(Gantrez))；アクリル酸とアクリレート及びアクリ酸ポリマーのコポリマー(例えば商品名ユードラジッド(Eudragit))；d又はl及び(d, l)ポリ乳酸すなわち乳酸とグリコール酸のコポリマー、ポリペプチド、グリコール誘導体(プロブオラクトン、ブチロラクトン、ピバロラクトン、 $\epsilon$ -カプロラクトンなどの誘導体)；ヒドロキシブチル酸の環状エステルから得られるポリマー、ヒドロキシイソブチル酸、ヒドロキシメチル-吉草酸、フェニル乳酸及び、ヒドロキシエチルブチル酸・ポリ $\beta$ ベンジルマラート；リンゴ酸やベンジルマラートのコポリマー；ポリビニルピロリドン-ビニルアセテート架橋コポリマー、アルキルポリシアノアクリレート；ポリ(エチレンビニルアセテート)；水溶性ポリマー(ゼチン、アラビアゴム、メチルセルロースなど)；オリゴマー(スチレンアリルアルコール)などを用いることができる。

また生物学的活性物質としては、特に活性医薬成分や活性医薬成分の前駆物質、或いは対照剤(contrasting agent)や生体試薬が掲げられる。本発明の場合、後で述べるように生物学的活性物とポリマーとの双方を含む超微粒子が製造されるので、有益である。

ここで用いられる「溶媒」又は溶液の混合物は、生物学的活性物質とポリマーを溶解しうる物質である。更にこの溶媒は使用されるこれらの物質に対する非溶媒と混和しうるものでなければならない。従って、多くの場合、溶媒は、液相(2)が水性相を構成するのに対し、液相(1)が有機相を構成しているような有機溶媒である。しかし可溶性、不溶性、混和性に関する諸条件が満たされるならば、二つの有機相や二つの水性相のいずれをも用いることが可能である。一方、溶媒はまた、必要に応じて除去しうる程に揮発性を有していなければならない

い。このような本発明の生物学的活性物質とポリマーに対する溶媒としては、低級アルコール(メタノール、エタノール、イソプロパノールなど)、低級ケトン(アセトン、メチルエチルケトンなど)、軽炭化水素又は軽炭化水素の混合物(ヘキサン、石油エーテルなど)、塩素化された軽炭化水素(クロロフォルム、塩化メチレン、トリクロロエチレンなど)、その他、アセトニトリル、ジオキサンなどの一般的軽溶媒が掲げられる。

これら生物学的活性物質とポリマーに対する「非溶媒」又は非溶媒の混合物としては、これらの物質を溶解しないと共に、使用される溶媒と混和可能な液体が用いられる；該ポリマーが商品名ユードラジッド(Eudragit) L100のようなアクリルポリマーである場合には、溶媒としては、アルカリ性水性相、非溶媒としては酸性水性相が用いられる。液相(1)の溶媒に低い割合(20重量%以下、例えば10重量%)の非溶媒を加えることによって10nm以下の粒径をもつより小さい超微粒子を得ることが可能である。

より安定した懸濁液を得るためには、一又はそれ以上の界面活性剤(又は乳化物)を加えることが望ましい。界面活性剤としては、アニオン(例えばラウリン硫酸ナトリウム)、カチオン(例えば第四級アンモニウム)又は非イオン(例えば、ポリオキシエチレン残基を含む又は含まないソルビタンモノエステル、脂肪酸アルコールとポリオキシエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリ-プロピレングリコールとで形成されるエーテルなど)が用いられる。

しかしながら、本発明に従えば超微粒子は界面活性剤なしに生産することが可能であり、更に凍結乾燥などにより全ての溶媒及び非溶媒が工程(4)において除去される場合には界面活性剤は不要である。このようにして長期間にわたって保存可能な凍結乾燥超微粒子を製造することができる。

工程(3)において製造されるコロイド状懸濁液内の界面活性剤の割合は0.1重量%乃至10重量%、好ましくは0.2重量%乃至2重量%である。

溶媒又は混合溶媒内のポリマーの濃度は0.1重量%乃至10重量%、好ましくは0.2重量%乃至2重量%である。

溶媒と非溶媒との容積比は、生物学的活性物質とポリマーの沈澱をもたらす程度でなければならない。この割合が増加するにつれ、超微粒子の大きさも小さくなる。

工程(3)で調製の際に加えられる適度な攪拌は、使用される物質の量に依っている。その量が少ない場合には攪拌は不要である。

本発明に係る工程の温度及びpHの影響は限られたものであり、特別な条件の下で作業をおこなう必要はない。しかし、工程(1)及び工程(2)における二つの液相が水性である場合には、それらが溶媒及び非溶媒であるという条件を満たすために、それぞれのpHを変える必要

がある。

更に、例えば塩化ナトリウムのような電解質の存在も超微粒子の生成に影響を与えるものではない。実施例1において超微粒子を生成した後、25mg/mlの濃度を有する塩化ナトリウムは、形成された超微粒子の癒着、沈澱の原因とはならなかった。

本発明に従い生産された粒子は該物質の物性が許せばオートクレーブ処理することも可能である。

〔発明の効果〕

本発明に係る超微粒子の製造方法は、従来の方法に比して以下のような利点をもたらす。

500nm以下の超微粒子の生産が可能であり、特に200nm以下の超微粒子をエネルギーを要しない単純な方法で生産することが可能であること；

物質として生物学的活性物質とポリマーとを含むものであるため、超微粒子はもはやモノマーの重合によって生成する必要はなく、公知のポリマーの「超微粒子化」によって生成することが可能となること；

合成ポリマーと同様に、長期にわたり無害でありかつ医療目的に用いられてきた天然ポリマーの利用が可能になること；

生体適合性を有するポリマーの利用が可能となること；

一旦、特定のpH値を与えれば、器官内で分離することができるようポリマーを用いることが可能となる。これにより、ポリマー粒子が器官内に蓄積しないことが保証される。

性質上、生体内に再吸収性を有し、その劣化による生成物が完全に無害であるポリマーを用いることが可能となること；及び

大きさのほぼ一定した球状粒子の生産が可能となることなどである。

〔実施例〕

以下、実施例に基づき本発明を説明する。得られた超微粒子は透過型電子顕微鏡により肉眼で把握でき（25,000～150,000倍）、ホスホタングステン酸による媒質染色後にはほぼ球状体の差異のない粒子として表れた。

実施例 1: インドメサシン（脂肪親和性活性成分）を含む超微粒子の調製

まず、125mgのポリ（d,l）乳酸（P.L.A）及び5mgのインドメサシンを250のアセトン中に溶かし、次に酸化エチレンとポリプロピレングリコール（商品名プルロニック（Pluronic）F68又はポロマイザー（Poloxamer）188）とによって形成される125mgの混合ポリマー及び非イオン性界面活性剤を50mlの蒸留水に溶かした。

アセトン相を磁気攪拌しながら水性相に加えた。混合物はポリマー（P.L.A）の超微粒子の形成のため、瞬時にオパール色を発する。調製直後にレーザービームを備えた回折計（クルトロニクス社製、商品名ナノサイザー（Nanosizer））により測定した超微粒子の平均粒径は1

80nm、分散指数1.5であった。

アセトンは減圧下（水ポンプ真空）除去され、懸濁液は同じ条件下で所望の容積、例えば10mlにまで濃縮される。

超微粒子の濃縮された懸濁液はガラスフリット（孔径9～15μm）又は膜フィルター（孔径5μm）により濾過され、濾過水中の超微粒子の粒径を測定したところ変わらず、分散指数も同様であった。透過型電子顕微鏡による検査によればポリ（d,l）乳酸の超微粒子は標準的な球状を呈した。

長期間（8ヶ月）放置した後であっても超微粒子の懸濁液の様子は変わらず、特に不可逆的な沈降分離も超微粒子の大きさのバラつきも観察されなかった。分散媒体として用いた水性相中のインドメサシンの超遠心分離及び滴定後の、超微粒子に含まれる活性成分の総量は当初存在した総量の80%であった。

b) 薬理試験：

インドメサシン5mg/kgを絶食させたラットに経口投与した場合、超微粒子の懸濁液は、溶液中のインドメサシンを同様に投与した後に観察された場合に比して、より速い完全なインドメサシンの消化吸收をもたらした。絶食させたラットに繰り返し投与（3日間連続、インドメサシン5mg/kg）したところ、溶液中のインドメサシンを同様に投与した後に観察された場合に比して、潰瘍形成や出血の数より明らかにされるように超微粒子の懸濁液は、一層進んだ消化許容度を示す。

静脈内滴注によりラットにインドメサシン5mg/kgを投与した場合には、超微粒子の懸濁液は、溶液中のインドメサシンを滴注後に観察される場合に比して、活性成分の血管外分布の増加（インドメサシンの分布量はほぼ2倍に増加）を示すインドメサシンの血漿濃度の経時的プロファイル（chronological profile）を生ぜしめる。また、それはその後ゆっくりと排出される（インドメサシンの生物学的半減期はほぼ2倍に増加）。

本発明により生成された超微粒子は多くの技術分野で応用され得るものである。

人間や動物の治療における薬剤のための「ベクター」として本超微粒子は次のような展望をもたらす。

－作用部位、特に細胞内やリソソーム内においても作用する部位を確保する。

－医薬の安定性及び／又は吸収性能を向上させることにより、又静脈滴注により吸収性のない医薬の活用を図ることができ、公知の医薬投与の新しい方法を付与する。

－望ましい作用部位に焦点を絞ることにより及び／又は例え毒性があろうと効能があろうと好ましくない作用を及ぼす部位から薬剤をそらすことにより、医薬の組織への分散を修正することができる（治療法の改善）。

又、薬学的には超微粒子状のコロイド分散系は、以下のような利点をもたらす。

－吸収性のない医薬を注入可能にする。

—膜形成ポリマーの水性分散を用いることによりガノレス製剤のコーティングを可能にする。

また、農業化学の分野では殺虫剤、農薬等の媒体として超微粒子を用いることが可能である。大きさが小さい\*

\*ため、表皮を通して浸透が良く、より強力な作用が期待できる。分散系の粘度が低いことは、非常に小さな水滴により噴霧を可能にし、より緊密なコーティングを可能にする。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

F I

D 2 1 H 19/00

D 2 1 H 1/10

(72)発明者

フランシス・ビュイズィオ

フランス国 94700メゾン・アルフォ, リ

ュ・ド・ストラスブール・66

(72)発明者

カート・スィーズ

アメリカ合衆国セント・ルイス, フォー

ン・メドース・305

(56)参考文献

特開 昭61-211342 (J P, A)

日本化学会編「新実験化学講座18界面とコロイド」p 348-349 (昭54年発行)

B、ヤーゲンソンス外1名著(玉虫文一訳)「コロイド化学」p 302-303, p 20, p 3-7 (昭和43年発行)